

TÚLIA KLEVESTON

**PTX3 – UM NOVO MARCADOR DA INFLAMAÇÃO DAS
VIAS AÉREAS?**

**Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
para a conclusão do Curso de Graduação em
Medicina.**

**Florianópolis
Universidade Federal de Santa Catarina
2008**

TÚLIA KLEVESTON

**PTX3 – UM NOVO MARCADOR DA INFLAMAÇÃO DAS
VIAS AÉREAS?**

**Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
para a conclusão do Curso de Graduação em
Medicina.**

**Coordenador do Curso: Prof. Dr. Maurício José Lopes Pereima
Orientador: Prof. Dra. Marcia Margaret Menezes Pizzichini
Co-orientador: Prof. Dr. Edelson Flávio Morato**

**Florianópolis
Universidade Federal de Santa Catarina
2008**

**A DEUS e aos meus pais,
Nelise Andréia Bortolotto Kleveston
e Rene Kleveston, peças indispensáveis
para minhas conquistas.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, luz que proporciona força na caminhada.

Aos meus pais, Nelise Andréia Bortolotto Kleveston e Rene Kleveston, pela dádiva da vida, educação, amor, carinho e, principalmente, pelos conselhos, valores e ensinamentos que guiaram as minhas escolhas.

Aos meus irmãos, Luísa Kleveston e Fábio Kleveston, pelo carinho e pelo amor dedicados nos momentos de presença e de saudade.

A todos os pacientes que se dispuseram a participar deste trabalho, pois sem eles este não se tornaria realidade.

À equipe do NUPAIVA – Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas: enfermeiras Cristiane Cinara Rocha, Maíra Chiaradia Perraro e Nazaré Otília Nazário, que pacientemente auxiliaram no recrutamento de pacientes, na realização dos procedimentos e na jornada de aprendizado. À técnica de laboratório, Célia Tânia Zimmermann, que processou o escarro, e à bioquímica Samira Ferreira que fez a contagem celular.

Ao professor Dr. Edelson Flávio Morato, pela paciência e disposição na co-orientação do trabalho, e pela realização da medida da PTX3 juntamente com professor Dr. José Tadeu Pinheiro.

À professora Dra. Marcia Margaret Menezes Pizzichini pela disposição, orientação, tempo dedicado, paciência, carinho e pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos professores Dra. Leila John Marques Steidle e Dr. Emílio Pizzichini pelo tempo, dedicação, colaboração e orientação.

À amiga Camila Marques de Valois pela amizade, pelos conselhos e pelo companheirismo durante grande parte do curso de graduação.

À Marina Costa do Amaral e à Patrícia Montagner Soares Silva pela força e amizade.

Aos amigos que conquistei no curso, principalmente à Aline Borges, Aline Kracik, Aline Zimmermann, Fabíola Cremonese, Flávia Citadin e Gabrielle Zattar, pelas palavras de perseverança que auxiliaram na conquista deste objetivo.

RESUMO

Introdução: Pentraxina 3 (PTX3) é uma molécula multifuncional apresentando tanto efeitos protetores contra autoimunidade como favorecendo reações auto-imunes dependendo do meio, disposição estrutural, perfil de citocinas e variação gênica. Seu papel nas doenças das vias aéreas ainda não foi estudado.

Objetivo: Investigar se a PTX3 pode ser medida no escarro induzido (EI).

Métodos: EI foi obtido de indivíduos controles sadios (n=16) e de pacientes livres de esteróides com asma (n=15) ou com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (n=13). EI foi processado como descrito por Pizzichini *et al.*¹ PTX3 foi medida em duplicata no sobrenadante do EI pelo método enzimaímunoensaio (ELISA) (limite de detecção = 0.15 ng/ml). Dados foram expressos como mediana e amplitude do semi-quartil.

Resultados: PTX3 estava acima do limite de detecção em 76.9% dos pacientes com DPOC, 46.7% dos asmáticos e em 18.8% dos controles (p = 0.007). Isto discriminou pacientes com DPOC dos controles, mas não DPOC dos asmáticos ou asmáticos dos controles. Pacientes com DPOC tiveram níveis significativamente maiores de PTX3 no EI [1.9 (0.37-12.6) ng/ml] do que os controles (p = 0.005), mas não do que asmáticos [0.15 (0.15-10.0) ng/ml, p = 0.47]. Os níveis de PTX3 foram inversamente correlacionados com os valores pós-broncodilator do VEF₁ litros (-0.528, p<0.001), VEF₁% do previsto (-0.624, p<0.001) e da razão VEF₁/CVF (-0.629, p<0.001).

Conclusões: PTX3 pode ser medida na fase líquida do EI e está aumentada em pacientes com DPOC. PTX3 pode representar um novo marcador para estudar a resposta inflamatória na asma e DPOC.

ABSTRACT

Introduction: Pentraxin 3 (PTX3) is a multifunctional molecule having both protective effect against autoimmunity and favoring autoimmune reactions depending on milieu, disposal structure, cytokine profile and gene variants. Its role in airway diseases has not been studied.

Objective: To investigate whether PTX3 can be measured in induced sputum (IS).

Methods: IS was obtained from healthy control subjects (n=16) and from steroid naive patients with asthma (n=15) or with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (n=13). IS was processed as described by Pizzichini *et al.*¹ PTX3 was measured in duplicates in the IS supernatant by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (limit of detection = 0.15 ng/ml). Data were expressed as median and interquartile range.

Results: PTX3 was above the limit of detection in 76.9% of patients with COPD, 46.7% of asthmatics and in 18.8% of controls (p = 0.007). It discriminated patients with COPD from controls but not COPD from asthmatics or asthmatics from controls. Patients with COPD had significantly higher levels of PTX3 in IS [1.9 (0.37-12.6) ng/ml] than controls (p = 0.005) but not than asthmatics [0.15 (0.15-10.0) ng/ml, p=0.47]. PTX3 was inversely correlated with post-bronchodilator values of FEV₁ liters (-0.528, p<0.001), FEV₁% from predict (-0.624, p<0.001), and VEF₁/FVC ratio (-0.629, p<0.001).

Conclusions: PTX3 can be measured in IS fluid phase and it is increased in patients with COPD. PTX3 may represent a new marker to study the inflammatory response in asthma and COPD.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BD	Broncodilatador
CP-20	Concentração provocadora de uma queda no VEF ₁ de 20%
CVF	Capacidade vital forçada
CCL2	CC-quimiocina ligante 2
CCT	Contagem celular total
CCR2	CC – receptor de quimiocina 2
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
CXCL1	CXC quimiocina ligante 1
CXCL8	CXC quimiocina ligante 8
CXCL9	CXC quimiocina ligante 9
CXCL10	CXC quimiocina ligante 10
CXCL11	CXC quimiocina ligante 11
CXCR3	CXC – receptor quimiocina 3
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ECP	Proteína de ativação eosinofílica
EI	Escarro induzido
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FEV ₁	<i>Forced expiratory volume in one second</i>
FVC	<i>Forced vital capacity</i>
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-13	Interleucina-13
IS	<i>Induced sputum</i>
NUPAIVA	Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas

PCR	Proteína C reativa
PTX3	Pentraxina longa 3
SAP	Componente amilóide P sérico
Tc1	T citotóxico 1
Th1	T <i>helper</i> 1
Th2	T <i>helper</i> 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VEF ₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

SUMÁRIO

FALSA FOLHA DE ROSTO.....	i
FOLHA DE ROSTO.....	ii
DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
SUMÁRIO.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Características clínicas e fisiopatológicas da asma e da DPOC.....	1
1.2 Escarro induzido na asma e na DPOC.....	3
1.3 PTX3.....	4
2 OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo geral.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3 PARTICIPANTES E MÉTODOS.....	7
3.1 Delineamento do estudo.....	7
3.2 Participantes.....	7
3.2.1 Critérios de inclusão do grupo controle.....	7
3.2.2 Critérios de inclusão do grupo asma.....	8
3.2.3 Critérios de inclusão do grupo DPOC	8
3.2.4 Critérios de exclusão.....	8
3.3 Métodos clínicos.....	9
3.3.1 Questionário.....	9
3.3.2 Espirometria.....	9
3.3.3 Teste cutâneo a alérgenos inalados.....	10
3.3.4 Broncoprovocação com metacolina nos participantes saudáveis.....	10
3.3.5 Indução do escarro.....	11

3.3.6	Processamento do escarro.....	11
3.3.7	Determinação da PTX3 no escarro pela técnica de ELISA.....	12
3.4	Análise estatística.....	13
4	RESULTADOS.....	14
4.1	Características celulares do escarro induzido.....	14
4.2	PTX3.....	15
5	DISCUSSÃO.....	19
6	CONCLUSÕES.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		23
NORMAS ADOTADAS.....		27
APÊNDICES.....		28

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características clínicas e fisiopatológicas da asma e da DPOC

A asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) são afecções das vias aéreas com alta prevalência em nosso meio.^{2, 3} A inflamação das vias aéreas é o componente central dessas duas condições, sendo responsável pelos sintomas, limitação ao fluxo de ar (variável ou fixa) e hiperresponsividade.⁴ Entretanto, as células e os mediadores envolvidos no processo inflamatório diferem nessas duas entidades clínicas.⁵ Neste intuito, identificar marcadores biológicos envolvidos no processo inflamatório poderia auxiliar na monitoração e na otimização do tratamento dessas doenças, o que, atualmente, é um dos principais objetivos da medicina respiratória.⁶

A asma é uma condição inflamatória crônica das vias aéreas caracterizada por hiperresponsividade brônquica, que resulta em episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, opressão torácica e tosse, principalmente noturna e no início da manhã. Esses episódios são geralmente associados com obstrução variável do fluxo de ar nas vias aéreas que usualmente é reversível espontaneamente ou com tratamento.⁷

Na maioria dos indivíduos com asma, a resposta inflamatória é caracterizada por um infiltrado eosinofílico na superfície da via aérea, associado a um aumento de mastócitos ativados e linfócitos T CD4+ (helper). Embora característica, a eosinofilia das vias aéreas não é exclusiva da asma e pode estar ausente em indivíduos portadores desta entidade clínica.^{5, 8}

Nos asmáticos, o aumento de linfócitos T CD4+ é predominantemente do tipo T *helper* 2 (Th2), que tem papel importante na inflamação alérgica. Os linfócitos Th2 são linfócitos que se diferenciam em células produtoras de citocinas como interleucina-4 (IL-4), IL-5 e IL-13, envolvidas na patogênese da asma. Os mastócitos, por sua vez, liberam citocinas, incluindo a IL-4, IL-5 e IL-13.

Além das alterações inflamatórias, também existe um envolvimento estrutural na asma, compreendendo a deposição de colágeno abaixo do epitélio (espessamento da membrana basal) associado à hipertrofia e hiperplasia da camada de células musculares lisas da árvore respiratória. Também ocorre aumento na angiogênese em resposta à secreção do fator de crescimento endotelial vascular, hiperplasia da camada mucosa, além de hipertrofia e hiperplasia das glândulas submucosas.^{5, 8, 9}

Em contraste com a asma, a DPOC é uma doença evitável e tratável, com alguns efeitos extra-pulmonares importantes. Seu componente pulmonar é caracterizado por limitação do fluxo de ar das vias aéreas que não é totalmente reversível. Essa limitação é geralmente progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas ou gases nocivos. Esse diagnóstico deve ser considerado em qualquer paciente que apresente tosse, produção de expectoração ou dispnéia associada à exposição aos fatores de risco da doença, como tabagismo.¹⁰

Na DPOC, a inalação da fumaça do cigarro e de outros irritantes ativa as células epiteliais e os macrófagos a liberarem inúmeros fatores quimiotáticos que atraem células inflamatórias para os pulmões, incluindo CC-quimiocina ligante 2 (CCL2), que atua no CC-receptor de quimiocina 2 (CCR2) para atrair monócitos, CXC-quimiocina ligante 1 (CXCL1) e CXCL8 (IL-8), que atuam nos CCR2 para atrair neutrófilos e monócitos (se diferenciam em macrófagos nos pulmões) e CXCL9, CXCL10 e CXCL11, que atuam nos CXCR3 para atrair linfócitos T *helper* 1 (Th1) e linfócitos T citotóxicos 1 (Tc1). Essas células inflamatórias juntamente com os macrófagos e células epiteliais liberam proteases que causam degradação da elastina e enfisema.

Assim, o processo inflamatório na DPOC é caracterizado por um infiltrado de linfócitos T (predominantemente CD8+ - citotóxicos), de macrófagos e de neutrófilos, particularmente na luz da via aérea. O aumento de neutrófilos no escarro de pacientes com DPOC se correlaciona com a gravidade da doença. Além do predomínio de linfócitos CD8+ na resposta inflamatória da DPOC, há um envolvimento de linfócitos T CD4+, os quais são predominantemente do tipo Th1, produzindo citocinas tais como interferon- γ e fator de necrose tumoral (TNF).^{5, 11, 12}

Diferentemente da asma, na DPOC há destruição da parede alveolar (enfisema) como resultado do balanço entre proteases e antiproteases no parênquima pulmonar. O aumento na produção de muco se deve a uma maior expressão do gene da mucina. Tanto na asma quanto na DPOC, existe um número aumentado de macrófagos, entretanto esse número é maior na DPOC.⁵ Por outro lado, cerca de um terço dos pacientes com DPOC pode apresentar processo inflamatório crônico eosinofílico.⁸

Em resumo, as células e os mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da asma e da DPOC são diferentes. Entretanto, em algumas situações, tanto a resposta inflamatória quanto as alterações fisiológicas podem ser similares nestas duas condições levando à dificuldade na distinção entre as mesmas, como acontece nos casos de asma grave não eosinofílica e na DPOC estável ou exacerbada associada à eosinofilia.^{4, 5}

O diagnóstico dessas condições é comprovado pela determinação, através de provas de função pulmonar, da presença de limitação ao fluxo de ar das vias aéreas, reversível no caso da asma e não reversível (ou com mínima reversibilidade) no caso da DPOC.^{2, 10}

1.2 Escarro induzido na asma e na DPOC

A medida da inflamação das vias aéreas inferiores é feita por meio de técnicas invasivas, como a broncofibroscopia de fibra óptica para obtenção de lavado broncoalveolar e/ou tecido brônquico ou por métodos minimamente invasivos, como o exame de escarro induzido.^{13, 14}

Um dos progressos mais importantes na investigação da inflamação das vias aéreas foi a introdução por Pin *et al.* em 1992¹³ da indução do escarro por meio da inalação de um aerossol de solução salina hipertônica para obter de modo direto secreções das vias aéreas na asma. Esse método tem uma série de vantagens, como segurança e praticabilidade, sobre o uso da broncoscopia.¹⁵

O método para obter escarro induzido é relativamente não-invasivo, podendo ser realizado de modo aleatório e repetitivo.¹⁴ O exame do escarro induzido pode ser aplicado em pacientes asmáticos ou com DPOC de diferente gravidade, desde que seja utilizado um método de indução modificado para garantir a segurança.¹⁶ Portanto, a indução do escarro para o exame da inflamação das vias aéreas, nessas condições, tem se transformado no método mais aplicável em pesquisa clínica dessas doenças respiratórias.¹⁷

A utilização do exame do escarro induzido em nosso meio foi introduzida por Pizzichini *et al.*¹ O exame dos componentes celulares e da fase líquida do escarro induzido é reprodutível, válido e responsivo às mudanças longitudinais.^{1, 14, 16} A determinação da resposta inflamatória celular tem se mostrado o melhor marcador para discriminar pacientes respondedores, ou não, aos corticosteróides inalatórios.¹⁸ Adicionalmente, medidas de marcadores inflamatórios como eosinófilos no sangue periférico ou medidas da proteína de ativação eosinofílica (ECP) no sangue periférico ou na fase líquida do escarro induzido não são mais acuradas em prever a resposta do que a simples contagem de eosinófilos em citospinas de escarro induzido.¹⁹

Nos últimos anos, um número crescente de pesquisadores têm utilizado a medida de diversos marcadores na fase líquida do escarro induzido para ser usada como marcador da resposta inflamatória em doenças respiratórias.^{8, 20}

1.3 PTX3

A pentraxina 3 (PTX3) é uma proteína de fase aguda pertencente à família das pentraxinas, assim como a proteína C reativa (PCR) e o componente amilóide P sérico (SAP); entretanto, estes últimos são pentraxinas curtas clássicas, enquanto a PTX3 é o protótipo de pentraxina longa. Diferentemente da PCR e do SAP que são produzidos exclusivamente pelo fígado após estímulo de citocinas inflamatórias, principalmente IL-6, a PTX3 pode ser produzida por uma variedade de células em resposta a estímulos pró-inflamatórios. Assim como as pentraxinas curtas clássicas, a PTX3 é composta por uma cadeia C-terminal, mas carrega adicionalmente uma porção N-terminal em sua molécula.^{21, 22}

A PTX3 é uma molécula multifuncional apresentando tanto efeitos protetores contra autoimunidade como favorecendo reações auto-imunes dependendo do meio, disposição estrutural, perfil de citocinas e variação gênica.²³ A PTX3 apresenta importante papel na imunidade inata contra patógenos específicos, na regulação da resposta inflamatória e na fertilidade. Sua expressão é induzida por IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e outros estímulos inflamatórios. Pode ser produzida nos sítios de infecção e inflamação por células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas, macrófagos, monócitos, células dendríticas e também neutrófilos. Nesse sentido, o aumento nos níveis da PTX3 pode refletir de maneira direta no processo inflamatório local.^{21, 24, 25}

A PTX3 também pode se ligar a um componente do complemento, C1q, e, dependendo em que circunstâncias esta interação acontece, a PTX3 pode ativar ou bloquear o complemento através da via clássica.^{21, 26}

Mais especificamente nos pulmões, PTX3 tem papel importante na defesa do hospedeiro contra infecções fúngicas, bacterianas e virais e no processo inflamatório ocasionado por dano tecidual persistente, infecções severas e outros agravos.²⁶⁻²⁸

Estudos têm demonstrado que aumento nos níveis de PTX3 pode ser um indicador precoce do infarto agudo do miocárdio ou de inflamação e espessamento da camada íntima vascular devido à implantação de *stent* coronariano.^{29, 30} Além disso, está correlacionado à gravidade de pacientes criticamente doentes.²⁸ Recentemente, tem-se observado aumento na expressão de PTX3 em infecção pulmonar e lesão pulmonar aguda induzida por ventilação mecânica em modelos animais.^{26, 31} Em pesquisas com humanos, observou-se que níveis séricos da PTX3 encontram-se elevados em pacientes com síndrome da angústia respiratória

aguda e que seus níveis estão correlacionados com o dano pulmonar e com o acometimento sistêmico.^{32, 33}

Portanto, poder-se-ia hipotetizar que a PTX3, em função de suas características, tem papel distinto na inflamação das vias aéreas encontradas na asma e na DPOC. Enquanto na asma a resposta imune é mediada por citocinas produzidas por linfócitos do tipo Th2, além de eosinófilos e mastócitos, na DPOC ela é predominantemente mediada por citocinas liberadas por linfócitos Th1, pela ação de macrófagos, linfócitos Tc1 e neutrófilos. Dessa forma, a PTX3 deve se encontrar mais elevada na resposta inflamatória encontrada nas vias aéreas de indivíduos portadores de um processo inflamatório local que apresente aumento de células envolvidas na sua produção e de citocinas inflamatórias indutoras da sua expressão, as quais parecem ser similares às encontradas na maioria dos pacientes com DPOC. Contudo, como na asma também existe processo inflamatório das vias aéreas e este pode ser diferente entre indivíduos portadores desta condição, a PTX3 também pode se encontrar elevada nas vias aéreas dos mesmos. Além disso, os níveis de PTX3 podem encontrar-se mais elevados em pacientes com maior gravidade, pois ela demonstrou correlacionar-se com o acometimento local e sistêmico em outras entidades clínicas.

Assim sendo, delineamos este estudo para investigar a exeqüibilidade e o poder discriminatório da medida da PTX3 na fase líquida do escarro induzido de indivíduos asmáticos e com DPOC sem tratamento com esteróides, ou seja, indivíduos que apresentam processo inflamatório crônico das vias aéreas, e comparamos com um controle sem resposta inflamatória. Neste intuito, podemos avaliar o tipo de resposta inflamatória local destes indivíduos e correlacioná-la com os níveis de PTX3.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar se a PTX3 pode ser medida na fase líquida do escarro induzido de três grupos: (1) indivíduos controle, (2) pacientes asmáticos e (3) portadores de DPOC.

2.2 Objetivos específicos

Comparar as concentrações da PTX3 na fase líquida do escarro induzido dos indivíduos com asma e DPOC entre si e com controles.

Analisar se existe correlação dos níveis de PTX3 com o grau de limitação ao fluxo de ar das vias aéreas destes indivíduos.

Analisar se existe correlação dos níveis de PTX3 com o tipo de resposta inflamatória celular encontrada nas vias aéreas destes indivíduos.

3 PARTICIPANTES E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal analisando o escarro induzido de pacientes portadores de asma ou DPOC e de controles saudáveis, o qual consistiu em uma visita única. Nessa visita, os participantes foram informados quanto aos objetivos do estudo, as características dos procedimentos realizados e de seus respectivos riscos. Após essa elucidação, os participantes que concordaram em participar do estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice 1). A seguir, os mesmos responderam a um questionário clínico estruturado, realizaram espirometria completa antes e após a utilização de um broncodilatador inalado, foram submetidos a teste cutâneo por punção e indução do escarro. Os indivíduos saudáveis realizaram, ainda, teste de broncoprovocação com metacolina. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina sob o protocolo número 201/05.

3.2 Participantes

No presente estudo foram incluídos 44 participantes, dos quais 15 eram asmáticos, 13 portadores de DPOC e 16 eram controles saudáveis sem doença respiratória (Tabela 1). Os indivíduos que preencheram os critérios de inclusão e não apresentavam critérios de exclusão foram consecutivamente incluídos no estudo entre julho de 2005 e novembro de 2006. Os pacientes asmáticos e portadores de DPOC foram referidos dos ambulatórios de pneumologia do Hospital Universitário da UFSC e os indivíduos saudáveis (controles) foram recrutados entre os pesquisadores, estudantes e colaboradores do Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas (NUPAIVA).

3.2.1 Critérios de inclusão do grupo controle

Nesse grupo do estudo foram selecionados adultos com idade superior a 18 anos, sem história de tabagismo, atópicos ou não, livres de doenças e sintomas respiratórios, portadores de espirometria normal, responsividade das vias aéreas à metacolina normal ($PC_{20} > 8$ mg/ml) e livres de infecção respiratória no último mês.

3.2.2 Critérios de inclusão do grupo asma

Nesse grupo, enquadraram-se os indivíduos com idade superior a 18 anos, que apresentavam sintomas episódicos de sibilância, opressão torácica e dispnéia no último ano. O diagnóstico de asma foi objetivamente confirmado pela presença de limitação reversível ao fluxo de ar das vias aéreas (aumento do $VEF_1 > 12\%$ após a inalação de broncodilatador de curta duração) nos participantes com limitação ao fluxo de ar ($VEF_1/CVF < 0.7$) ou por hiperresponsividade das vias aéreas à metacolina ($PC20 < 8\text{mg/ml}$) quando o valor do VEF_1 fosse superior a 70% do previsto.⁷ Todos apresentavam asma com sintomas estáveis indicada pela presença de sintomas que não se alteraram na última semana. Os participantes desse grupo estavam livres de infecção respiratória e de tratamento com corticoterapia, beta dois agonista de ação prolongada e antagonista do receptor de leucotrieno nas últimas quatro semanas.

3.2.3 Critérios de inclusão do grupo DPOC

Esses pacientes eram adultos que apresentavam sintomas respiratórios associados à obstrução ao fluxo de ar das vias aéreas ($VEF_1 < 80\%$ do previsto com um $VEF_1/CVF < 0.7$) com reversibilidade inferior a 15% e inferior a 200 ml associados à história de tabagismo importante (superior a 20 maços/ano) ou exposição a outros irritantes.¹⁰ Apresentavam DPOC com sintomas estáveis indicada pela presença de sintomas que não se alteraram na última semana. Estavam livres de infecção respiratória e de tratamento com corticoterapia nas últimas quatro semanas.

3.2.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos desse trabalho os indivíduos que apresentavam outras doenças pulmonares conhecidas (fibrose cística, pneumonia), doenças graves de outros aparelhos ou uso de medicações que possam confundir os resultados e gestantes.

Tabela 1: Características clínicas e fisiológicas dos participantes

	<u>Controle</u> (n=16)	<u>Asma</u> (n=15)	<u>DPOC</u> (n=13)
Idade, anos	31.6 (12.4)	32.5 (12.5)	61.1 (7.9)
Sexo, masculino n (%)	7 (43.8)	4 (26.7)	9 (62.2)
Atopia, n (%)	7 (43.8)	14 (93.3)	8 (72.7)
Nunca fumaram, n (%)	16 (100)	9 (60.0)	0 (0)
Carga tabágica, maços/ano	0	1.5 (0-10)	45.5 (20-72)
VEF₁ pré BD, %*	94.6 (11.9)	77.2 (17.4)	46.6 (15.5)
VEF₁ pós BD, %*	97.5 (11.2)	86.1 (17.0)	51.0 (15.5)
VEF₁ /CVF pré BD, %	84.6 (5.2)	67.5 (11.4)	44.9 (12.1)
VEF₁ /CVF pós BD, %	87.1 (4.5)	73.2 (11.8)	44.7 (12.6)
Δ VEF₁ pós BD, ml	73.0 (96.0)	339 (169)	130 (115)
Δ VEF₁ pós BD, %	3.2 (4.5)	14.2 (6.6)	10.9 (10.1)

Variáveis contínuas estão expressas como média e desvio padrão enquanto que as variáveis dicótomos estão expressas como percentual.

Atopia significa um ou mais teste por punção com um halo de resposta ≥ 2 mm em relação ao controle negativo.

VEF₁ = volume expiratório forçado no primeiro segundo

CVF = capacidade vital forçada

BD = broncodilatador (salbutamol).

Δ - resposta broncodilatadora

* valores previstos para VEF₁ e CVF baseados em Crapo *et al*³⁴

3.3 Métodos clínicos

3.3.1 Questionário

Para a realização desse processo investigatório, foi utilizado um questionário contendo história médica para documentar elegibilidade. As informações essenciais incluíram idade, sexo, duração da doença, data e duração da última exacerbação, doenças sistêmicas associadas, admissões hospitalares no último ano, medicação em uso (dose e duração), história de alergias, sintomas de infecção viral, intolerância a aspirina ou a outros antiinflamatórios não hormonais, história de tabagismo ou exposição a inalantes como poeiras ou produtos químicos (apêndices 2 e 3).

3.3.2 Espirometria

A espirometria foi realizada de acordo com as especificações da *American Thoracic Society* (ATS)³⁵ antes e após broncodilatador inalatório administrado via espaçador (Aerochamber®). Para tanto, foi utilizado um espirômetro computadorizado Koko-Trek Spirometer® (Trudal Medical, London, Ontario). Os valores da normalidade previstos utilizados foram os publicados por Crapo *et al*.³⁴

3.3.3 Teste cutâneo a alérgenos inalados

Atopia foi verificada através da realização de teste cutâneo por puntura (*Skin Prick Test*®) usando uma técnica modificada.³⁶ Foram testados os 12 alérgenos mais comuns em nosso meio, controle negativo (glicerol e tampão) e positivo (histamina e fosfato - 10 mg/ml). A leitura dos resultados foi feita 15 minutos após. O resultado foi expresso através do diâmetro em milímetros dos halos cutâneos encontrados.

Foram considerados atópicos os indivíduos que apresentaram um ou mais halos cutâneos com um diâmetro dois milímetros superior ao obtido com o controle negativo.

3.3.4 Broncoprovocação com metacolina nos participantes sadios

Os pacientes sadios foram submetidos ao exame de broncoprovocação com metacolina para verificar se apresentavam hiperresponsividade das vias aéreas. Foi realizado de acordo com o método descrito por Juniper et al.³⁷

Após a espirometria, os participantes sadios realizaram a inalação de solução salina isotônica durante dois minutos, com uso de “clipe” nasal, através de um nebulizador Wright (Aerosol Medical Limited: Colchester, Essex, Reino Unido) com fluxo de 0,13 ml/min. Após a inalação dessa solução, foram medidos os VEF₁ aos 30, 60 e 180 minutos. Se o VEF₁ obtido aos 180 segundos fosse inferior ao obtido aos 90 segundos, eram realizadas medidas adicionais até que o valor do último VEF₁ fosse maior que o anterior. Se não houvesse queda superior a 20% do VEF₁ basal, era iniciada a inalação de metacolina na concentração de 0,03 mg/ml, também por dois minutos. Foram realizados os mesmos procedimentos que se seguiram à inalação de solução salina isotônica. Doses dobradas de metacolina foram progressivamente administradas até que ocorresse queda de 20% do VEF₁ (PC20) ou que a dose de 8mg/ml fosse administrada.

Os resultados foram expressos como CP20 (Concentração provocadora de uma queda no VEF₁ de 20%) em unidades não cumulativas.

Foram considerados portadores de responsividade normal das vias aéreas à metacolina os participantes que apresentaram ausência de queda ou queda do VEF₁ inferior a 20% após a inalação de um aerossol de metacolina em doses crescentes até a dose de 8mg/ml, administrado durante dois minutos.³⁷

3.3.5 Indução do escarro

A indução do escarro foi realizada pelo método descrito por Pizzichini *et al.*^{1, 15} O procedimento foi iniciado 10 minutos após a administração de 200µg de salbutamol inalado por meio de aerossol por dose medida, através da inalação de um aerossol de solução salina em concentrações crescentes (0,9%, 3%, 4% e 5%), cada uma destas inalada por três a quatro minutos sucessivamente até a obtenção de escarro suficiente para análise ou até queda do VEF₁ igual ou superior a 20% em relação ao valor basal. Utilizou-se nebulizador ultra-sônico Fisoneb (Fisons, Pickering, Ontario, Canadá), com débito de 0,87 mL/min e partículas com diâmetro aerodinâmico de massa mediano de 5,57µm. Após cada período de inalação, o VEF₁ foi medido para garantir a segurança do teste, sendo que a concentração da solução salina não era aumentada caso ocorresse uma queda do VEF₁ entre 10 e 19% em relação ao valor basal.

Após cada inalação, os pacientes foram instruídos a enxaguar a boca, engolir a água e assoar o nariz para evitar a contaminação do expectorado com saliva ou secreção pós-nasal. A seguir foram orientados a tossir e recolher o escarro num recipiente estéril.

3.3.6 Processamento do escarro

O escarro foi processado dentro de duas horas conforme previamente descrito.¹ O escarro recém coletado foi espalhado em uma placa de Petri e todas as porções mais opacas e densas, melhor visualizadas ao microscópio invertido, que pareciam diferentes de saliva, foram separadas, colocadas dentro de um tubo de 15 ml de poliestireno e pesadas.³⁸ Esse material foi tratado com dithiothreitol (Sputolysin 10%, Calbiochem Corp.; San Diego, Califórnia), diluído a 1:10 com água destilada, em um volume quatro vezes maior do que o peso do escarro selecionado para análise. A mistura foi turbilhonada por 15 segundos, aspirada com uma pipeta e, a seguir, recolocada no tubo, sendo posteriormente colocada em homogenizador (Speci-mix; Barnstead/Thermolyne; Dubuque, Iowa, EUA) por 15 minutos. Adicionou-se então, salina tamponada com fosfato de Dulbecco em uma quantidade igual a quatro vezes o volume do escarro selecionado. O resultante foi homogenizado por mais 5 minutos. A seguir, esta solução foi filtrada através de uma malha de *nylon* com 48 µm de diâmetro (BBSH, Thompson, Scarborough, Ontário) para remover debris celulares e o muco restante. A contagem de células foi feita em um hemocitômetro de Neubauer modificado e a viabilidade celular foi determinada simultaneamente corando a lâmina com Trypan blue. O número total de células por miligrama foi calculado e expresso em milhões por grama de escarro processado. O centrifugado foi preparado colocando-se em média 75 µl de suspensão de células, ajustada para obter uma concentração de $1,0 \times 10^6$ /ml, em uma citocentrífuga

Shandon 3 (Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA, EUA) funcionando em 450 rotações por minuto durante seis minutos. As lâminas foram secas ao ar, coradas com May-Grünwald Giemsa e a contagem diferencial de células realizada em 400 células não escamosas.

A amostra foi considerada adequada se a contagem total e diferencial de células pudesse ser determinada, sendo os resultados expressos em milhões de células por grama de escarro. O material restante foi colocado em um tubo de Eppendorf e novamente centrifugado em um microcentrífuga IEC Micromax funcionando em 3000 rotações por minutos durante quatro minutos. Em seguida, separou-se cuidadosamente o sobrenadante da porção celular. O sobrenadante do escarro foi armazenado em tubos de Eppendorf a -70°C para posterior dosagem de PTX3.

3.3.7 Determinação da PTX3 no escarro pela técnica de ELISA

Foi utilizada uma placa de ELISA (NUNC, Roskilde, Denmark) contendo 96 “pocinhos”. Estes foram sensibilizados, individualmente, com 100 µl de anticorpo monoclonal (mAb) anti-PTX3 MNB4 (líquido de ascite diluído 1:500 em tampão de sensibilização). As placas foram incubadas a 4°C por 24 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas, por três vezes, com PBS (phosphate buffered saline) de Dulbecco, contendo 0,05% de Tween 20 (tampão de lavagem), em um lavador automático de placas de ELISA. A seguir, foram adicionados 200 µl de leite em pó desnatado para cada “pocinho”, a 5%, no intuito de bloquear sítios de ligações inespecíficos. Após 2 horas de incubação, à temperatura ambiente, as placas foram lavadas por três vezes com o tampão de lavagem. As amostras de escarro, assim como os padrões de PTX3 recombinante purificada (150 pg/ml a 9,6 ng/ml) foram diluídos em meio RPMI 1640 (Seromed, Berlin, Germany), acrescido de soro albumina bovina (BSA, Sigma Chemicals, St. Louis, CO) a 2% e adicionados na placa em alíquotas de 50 µl por “pocinho”, em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por duas horas. Após a incubação, as placas foram lavadas por três vezes com o tampão de lavagem. A seguir, em cada “pocinho”, foram adicionados 100 µl de IgG (imunoglobulina G) de coelho conjugado à biotina e dirigida contra a PTX3, diluída a 1:20000 em tampão de lavagem. Após incubação a 37°C por uma hora, as placas foram novamente lavadas por três vezes com o tampão de lavagem. A seguir foram adicionados 100 µl, por “pocinho”, de estreptavidina-peroxidase conjugadas ao dextran (Amdex, Compenhagen, Denmark), na diluição de 1: 4000, e as placas

incubadas por uma hora na temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas por três vezes e, então, adicionados 100 µl de substrato cromógeno ABTS Microwell Substrate System (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) por “pocinho”. Após 15 minutos, as amostras nas placas foram lidas em 405 nm, em um leitor automático de ELISA, e os resultados calculados a partir das leituras em duplicata das amostras e das concentrações conhecidas de PTX3, para determinação da curva padrão. Não ocorrem reações cruzadas nessa técnica de dosagem.²⁷ O limiar de detecção da PTX3 na fase líquida do escarro induzido foi de 0,15 ng/ml.

3.4. Análise estatística

As variáveis categóricas foram sumarizadas através de frequência absoluta e percentagens. Os dados de distribuição normal encontram-se sumarizados como média e desvio padrão. Aqueles de distribuição não normal encontram-se sumarizados como mediana e amplitude do semi-quartil e, quando requerido, sofreram transformação logarítmica. Correlações entre variáveis foram feitas por meio do teste de Pearson. As diferenças entre os grupos foram obtidas através da análise de variância unidirecional (ANOVA) e teste de Bonferroni. Para evitar diferenças significativas por chance, a significância foi aceita ao nível de 99%. Todos os testes estatísticos foram bicaudais. O *software* utilizado para análise do banco de dados foi o SPSS para *Windows* versão 13.0.

4 RESULTADOS

4.1. Características celulares do escarro induzido

As características celulares do escarro induzido nos três grupos de pacientes estão descritas na tabela 2 e na figura 1. Observaram-se diferenças significativas ($p < 0.01$) na viabilidade, no percentual de neutrófilos e de eosinófilos. A viabilidade foi significativamente maior no grupo DPOC em comparação com o grupo asma. O percentual de neutrófilos também foi maior no grupo DPOC em relação ao grupo controle e ao grupo asma. Já o percentual de eosinófilos foi maior no grupo asma se comparado com os outros dois grupos.

Tabela 2: Características do escarro induzido

	Controle	Asma	DPOC
Viabilidade, %	79.1 (11.9)	76.5 (27.7)	90.2 (6.2)*
CCT x 10 ⁶ /g	3.1 (2.8)	3.0 (2.6)	6.2 (4.6)
Neutrófilos, %	20 (18.2)	8.0 (27)	43 (31.2)†
Eosinófilos, %	0 (0)	5.5 (20)‡	1.0 (2.5)
Macrófagos, %	70 (29)	60 (32)	49 (30.2)
Linfócitos, %	3.0 (4.5)	3.0 (4.5)	2.0 (2.0)

Resultados expressos como mediana e amplitude do semi-quartil.

CCT - Contagem celular total

* Diferença significativa ($p = 0.003$) para DPOC e asma.

† Diferença significativa ($p = 0.002$) para DPOC e asma e ($p = 0.009$) para DPOC e controle.

‡ Diferença significativa ($p < 0.000$) para asma e controle e ($p = 0.001$) para Asma e DPOC.

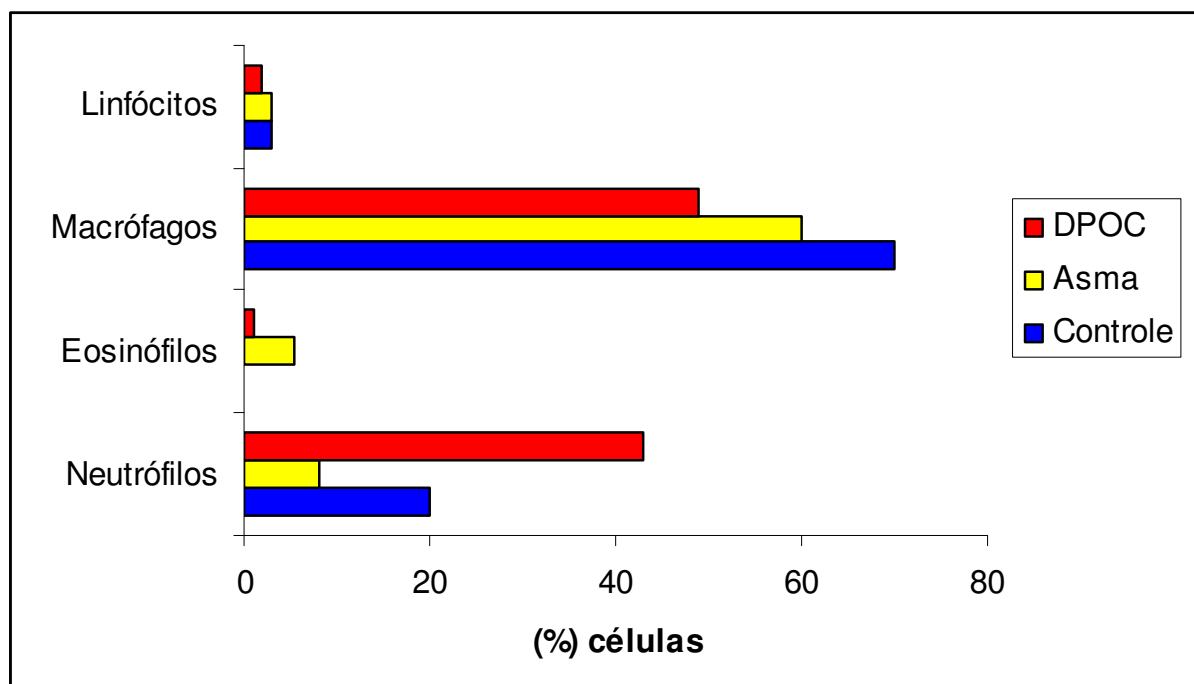
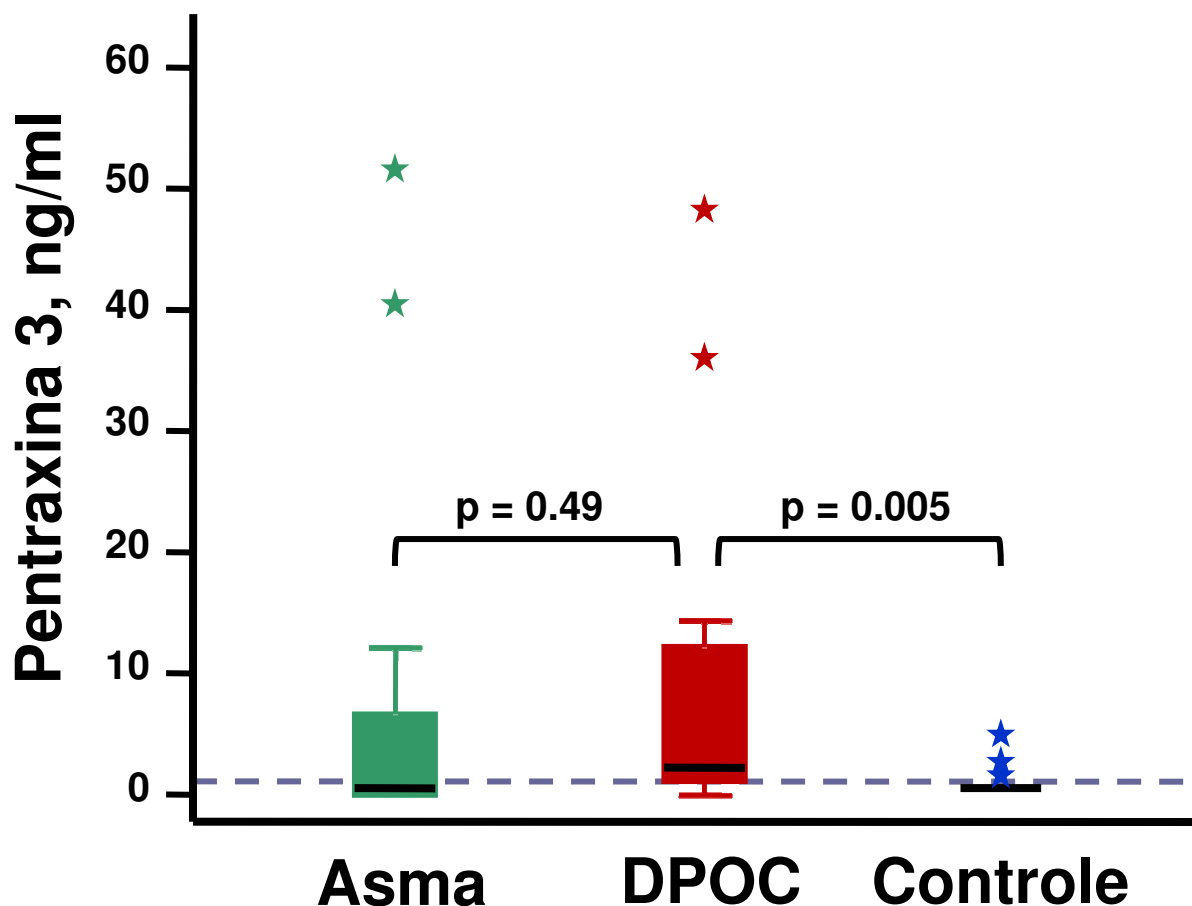


Figura 1: Celularidade do escarro induzido nos três grupos de pacientes

4.2. PTX3

Os resultados da medida da PTX3 na fase líquida do escarro induzido estão apresentados na figura 2. Ela foi detectada (acima de seu limiar de 0.15 ng/ml) em 76.9% dos pacientes com DPOC, 46.7% dos asmáticos e em 18.8% dos controles ($p = 0.007$). Isso discriminou pacientes com DPOC dos controles, mas não DPOC dos asmáticos ou asmáticos dos controles. A mediana da medida da PTX3 na fase líquida do escarro induzido nos pacientes com DPOC foi 1.9 ng/ml (amplitude do semi-quartil de 12.1 ng/ml) e significativamente maior que nos pacientes do grupo controle que apresentaram mediana inferior ao limiar de detecção (amplitude do semi-quartil de 0 ng/ml, $p=0.005$). No grupo asma, a mediana do valor da PTX3 também foi menor que o nível de detecção da mesma (amplitude do semi-quartil de 9.8 ng/ml). Apesar de a medida da PTX3 observada ter sido maior no grupo DPOC em relação ao grupo asma, essa diferença não foi estatisticamente significativa.



Estrelas = “outliers”; * Barras horizontais das caixas representam os percentis 25, 50 (em preto) e 75%, as barras de erro representam os percentis 5 e 95%.

Figura 2 – Dosagem da PTX3 na fase líquida do escarro induzido dos três grupos*

Os resultados obtidos não demonstraram correlação entre a medida da PTX3 na fase líquida do escarro induzido e os tipos de células inflamatórias encontradas no exame de escarro induzido (eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos). Contudo, existiu uma correlação inversa entre PTX3 e os valores pós-broncodilatador do VEF₁ litros (-0.528, $p < 0.001$), VEF₁% do previsto (-0.624, $p < 0.001$) e da razão VEF₁/CVF (-0.629, $p < 0.001$) (figuras 3 e 4).

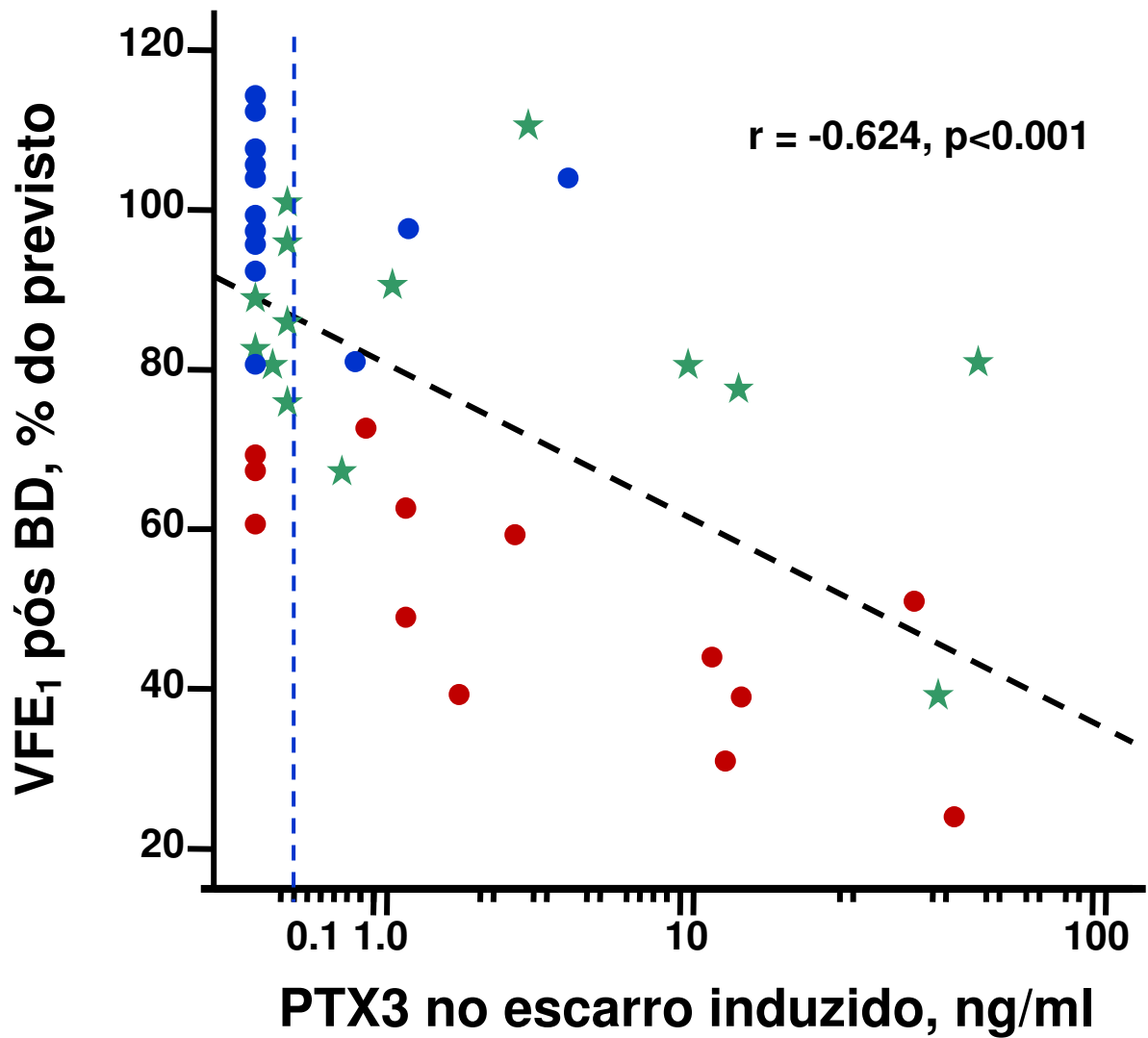


Figura 3 – Correlação entre PTX3 no escarro induzido e VEF₁ pós-broncodilatador expresso em percentual do previsto.

VEF₁ = volume expiratório forçado no primeiro segundo, valor pós-broncodilatador

PTX3 - pentraxina longa 3

Círculos azuis = controles hígidos, estrelas = asma, círculos vermelhos = DPOC

Linha horizontal chuleada = limite de detecção da PTX3.

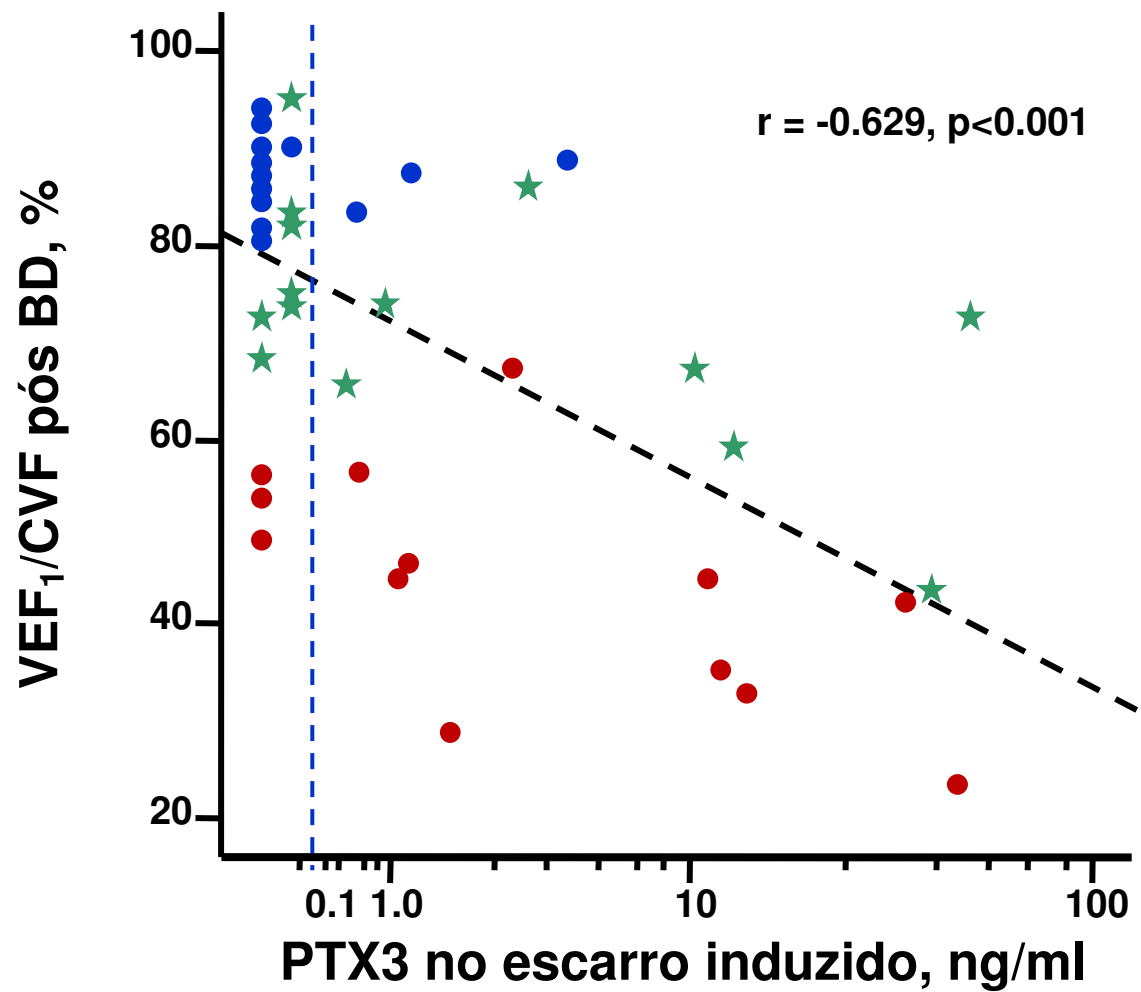


Figura 4 – Correlação entre PTX3 no escarro induzido e razão VEF₁/CVF pós-broncodilatador.

VEF₁ = volume expiratório forçado no primeiro segundo, valor pós-broncodilatador

CVF = Capacidade vital forçada, valor pós broncodilatador

PTX3 – pentraxina longa 3

Círculos azuis = controles hígidos, estrelas = asma, círculos vermelhos = DPOC

Linha horizontal chuleada = limite de detecção da PTX3.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que a PTX3 pode ser medida no sobrenadante do escarro induzido. Além disso, os níveis de PTX3 foram significativamente mais elevados nos pacientes com DPOC que nos controles saudáveis. Adicionalmente, os níveis de PTX3 correlacionaram-se diretamente com a limitação ao fluxo de ar das vias aéreas. Isto é relevante porque possibilita estudos posteriores utilizando essa medida como marcador do processo inflamatório local das vias aéreas nos pacientes portadores de bronquite devido à DPOC ou asma. Ao mesmo tempo, estudos mais abrangentes poderão investigar a PTX3 como fator prognóstico nos pacientes com DPOC ou inflamação das vias aéreas.

Este é o primeiro estudo a demonstrar que a PTX3 pode ser medida no escarro induzido de pacientes portadores de asma e DPOC. Até o presente, a PTX3 não tem sido implicada na patogênese destas duas condições. Nesse estudo, a PTX3 estava acima do limite de detecção na grande maioria dos pacientes portadores de DPOC (76.9%), o que está alinhado com publicações anteriores mostrando que em pacientes com DPOC ocorre uma resposta inflamatória mediada principalmente pela imunidade do tipo inata⁵, uma vez que a PTX3 é produzida em resposta a estímulos pró-inflamatórios por células como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos.²¹ O fato de não termos encontrado uma correlação positiva entre neutrófilos e PTX3 possivelmente se deve ao tamanho da amostra e por que vários participantes apresentaram valores de PTX3 abaixo do limiar de detecção.

Apenas 46.7% dos asmáticos tiveram valores de PTX3 acima do limite de detecção o que pode ser consequência da presença de processos inflamatórios distintos dentro do próprio grupo. Adicionalmente, as citocinas usualmente envolvidas na patogênese da asma estão associadas à resposta tipo 2 (IL-4 e IL-13) as quais não parecem aumentar a produção de PTX3. Ao contrário, tem sido relatado que a IL-4 inibe a expressão de PTX3 pelos fibroblastos.³⁹

Os níveis de PTX3 no escarro induzido dos indivíduos hígidos estavam acima do limiar de detecção em apenas três ocasiões. Os valores da normalidade da PTX3 no soro já estão estabelecidos, sendo que o valor de 2.0 ng/ml é considerado como limite superior²⁶. Em nosso estudo todos os valores acima do limite de detecção foram considerados aumentados, uma vez que na maioria dos indivíduos hígidos a PTX3 não foi detectada.

A literatura reitera o papel da PTX3 sérica como marcador de processo inflamatório em diversos aparelhos e sistemas. Até o presente momento a PTX3 tem sido considerada relevante na patogênese de doença cardiovascular²⁹, fertilidade, integridade vascular, gestação²³, na defesa do hospedeiro contra infecções fúngicas, bacterianas e virais²¹ e no processo inflamatório ocasionado por dano tecidual persistente, infecções severas e outros agravos²⁸. Neste estudo a presença de uma correlação entre PTX3 e a gravidade da limitação ao fluxo de ar das vias aéreas sugere que essa molécula pode ter importância na patogênese da DPOC. Contudo, outros estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Mais especificamente nos pulmões, estudos recentes mostraram que a injeção endovenosa de lipopolisacáride (LPS), presente na parede celular de inúmeros patógenos, induz a expressão de PTX3 no epitélio alveolar em ratos. Utilizando-se linhagens de células pulmonares humanas, o aumento da expressão da PTX3 foi induzido por TNF- α .⁴⁰ Em outro estudo com modelos animais, foi demonstrado que a expressão da PTX3 pode ser regulada por ventilação mecânica (alto volume), sozinha ou em combinação com outros processos patológicos, através da medida da PTX3 no pulmão dos animais estudados e que seus valores estavam, impressionantemente, relacionados com parâmetros de lesão pulmonar.³¹ Além disso, em ensaios clínicos, os níveis de PTX3 encontraram-se elevados em pacientes com lesão pulmonar aguda e síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) no soro e também, quando realizado, no lavado broncoalveolar. Os níveis de PTX3 foram positivamente correlacionados com parâmetros de lesão pulmonar, números de órgãos em falência e mortalidade.³³ Dessa forma, é inegável a importância da PTX3 no processo inflamatório quando existe algum tipo de lesão pulmonar.

Em relação à contagem diferencial de células do escarro induzido dos três grupos de pacientes, os resultados obtidos confirmam, em parte, estudos publicados anteriormente. No grupo controle os resultados demonstraram uma contagem de macrófagos e eosinófilos semelhante a de outros estudos realizados com pacientes hígidos^{41,42}. No entanto, a proporção de neutrófilos foi consideravelmente menor que a publicada anteriormente. Um deles publicado por Belda *et al*⁴¹ obteve uma mediana de 36.7% de neutrófilos, 60% de macrófagos, 0% de eosinófilos e 0.5% de linfócitos. Spanevello *et al*⁴² obteve uma mediana de 28.5% de neutrófilos, 69% de macrófagos, 0.2% de eosinófilos e 0.8% de linfócitos. Uma taxa inferior de neutrófilos no escarro induzido já foi encontrada em estudos realizados em Florianópolis⁴³, o que pode ser reflexo de uma menor taxa de poluição urbana.

No grupo asma, a contagem diferencial de células no escarro induzido obtido em outros estudos como Lee *et al*⁴³, que estudou asmáticos virgens de tratamento com

corticosteróides, demonstrou uma mediana de 14.4% de neutrófilos, 60.3% de macrófagos, 6.4% de eosinófilos e 1.1% de linfócitos. Pizzichini *et al*¹ obteve uma mediana de 5.2% de eosinófilos e de 46% de neutrófilos no escarro induzido de asmáticos. Os resultados foram parecidos com os obtidos neste trabalho em relação ao eosinófilos e macrófagos. Nesse grupo, o número de neutrófilos foi menor se comparado aos estudos citados.

Uma mediana de 0.7% de eosinófilos e 46.7% de neutrófilos foi encontrada por Balzano *et al*⁴⁴ no escarro induzido de pacientes portadores de DPOC. No presente estudo, foi encontrado um percentual de eosinófilos e neutrófilos similar. Keatings e Barnes⁴⁵ encontraram um percentual significativamente maior de neutrófilos no escarro induzido de pacientes com DPOC em comparação com o escarro de pacientes com asma e controles saudáveis, assim como o verificado em nosso estudo.

Uma das limitações desse estudo foi o tamanho da amostra, principalmente do grupo DPOC. Isso ocorreu pela dificuldade de recrutar pacientes portadores desta enfermidade livres de tratamento com corticosteróides. Além disso, trata-se de pacientes de idade mais avançada, que geralmente apresentam co-morbidades associadas que poderiam confundir os resultados. Esse fato pode ter interferência nos níveis elevados da PTX3 encontrados no sobrenadante do escarro induzido dos participantes do grupo DPOC.

Outra limitação foi o fato de a PTX3 ter sido dosada somente na fase líquida do escarro induzido. O sangue periférico dos pacientes poderia ter sido coletado para se fazer uma análise comparativa entre as duas dosagens, verificando se a medida da PTX3 na fase líquida do escarro reflete a observada no sangue periférico, ou se ela está somente aumentada no sítio de inflamação, neste caso, nas vias aéreas. Entretanto, nosso objetivo era apenas o de verificar se a PTX3 era mensurável no escarro induzido.

Em resumo, o presente estudo é relevante por oferecer um novo marcador para o processo inflamatório das vias aéreas. Estudos posteriores, com uma amostra maior, em pacientes que apresentem distintos tipos de inflamação e gravidade da enfermidade se fazem necessários para elucidar o papel da PTX3 na fisiopatologia, na prática clínica e no prognóstico da inflamação das vias aéreas, especialmente na DPOC. Além disso, essa elucidação poderá auxiliar na monitoração do tratamento destas e de outras doenças das vias aéreas ou, até mesmo, orientar novos métodos terapêuticos.

7 CONCLUSÕES

1. A PTX3 foi detectada e pode ser medida na fase líquida do escarro induzido.
2. A medida da PTX3 na fase líquida do escarro induzido foi significativamente maior no grupo DPOC em relação ao grupo controle.
3. Os níveis de PTX3 apresentaram correlação direta com o grau de limitação ao fluxo de ar das vias aéreas.
4. Não houve correlação entre a concentração de PTX3 na fase líquida do escarro induzido e o tipo de resposta inflamatória celular encontrada nas vias aéreas dos participantes.
5. Estudos posteriores se fazem necessários para melhor definir o papel da PTX3 na inflamação das vias aéreas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Aug;154(2 Pt 1):308-17.
2. III Consenso brasileiro de manejo da asma. *J Pneumol* 2002; 28 (Supl 1): 1-29.
3. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica 2004; 30 (Supl 5).
4. Hargreave FE, Parameswaran K. Asthma, COPD and bronchitis are just components of airway disease. *Eur Respir J*. 2006 Aug;28(2):264-7.
5. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Mar;8(3):183-92.
6. Proceedings of a Workshop. Airway inflammation and remodeling in asthma: implications for asthma therapy. *Anc Respir J*. 1996;5:15-70.
7. Global initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Washington: National Heart Lung and Blood Institute, National Institute of Health. 2004, 96-3659, 1-176.
8. Lacy P, Lee JL, Vethanayagam D. Sputum analysis in diagnosis and management of obstructive airway diseases. *Ther Clin Risk Manag*. 2005 Sep;1(3):169-79.
9. O'Byrne P M, Postma DS. The many faces of airway inflammation. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Asthma Research Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 May;159(5 Pt 2):S41-63.
10. Global Strategy for Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Global Initiative for Chronic obstructive Lung Disease (GOLD) 2007 [atualizada em 2007 Dec; acesso em 2008 Aug 10]. Disponível em: <http://www.goldcopd.org>.
11. Corrigan CJ, Kay AB. The roles of inflammatory cells in the pathogenesis of asthma and of chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*. 1991 May;143(5 Pt 1):1165-8; discussion 75-6.
12. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV₁. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Mar;155(3):852-7.
13. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992 Jan;47(1):25-9.

14. Hargreave FE, Pizzichini E, Pizzichini MMM. Assessment of airway inflammation. In: Barnes P, Grunstein M, Leff A, Woolcock A, editors. *Asthma*. Philadelphia PA: Lippincott-Raven; 1997. p.1433-50.
15. Pizzichini E, Pizzichini MM, Leigh R, Djukanovic R, Sterk PJ. Safety of sputum induction. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:9s-18s.
16. Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Mahony J, Dolovich J, et al. Sputum in severe exacerbations of asthma: kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 May;155(5):1501-8.
17. Brightling CE. Clinical applications of induced sputum. *Chest*. 2006 May;129(5):1344-8.
18. Pizzichini E, Pizzichini MM, Gibson P, Parameswaran K, Gleich GJ, Berman L, et al. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Nov;158(5 Pt 1):1511-7.
19. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Dolovich J, Hargreave FE. Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Apr;99(4):539-44.
20. in 't Veen JC, de Gouw HW, Smits HH, Sont JK, Hiemstra PS, Sterk PJ, et al. Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma. *Eur Respir J*. 1996 Dec;9(12):2441-7.
21. Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol*. 2008 Jan;28(1):1-13.
22. Doni A, Peri G, Chieppa M, Allavena P, Pasqualini F, Vago L, et al. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2003 Oct;33(10):2886-93.
23. Ortega-Hernandez OD, Bassi N, Shoenfeld Y, Anaya JM. The Long Pentraxin 3 and Its Role in Autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum*. 2008 Jul 8.
24. Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood*. 1994 Nov 15;84(10):3483-93.
25. Imamura M, Kawasaki T, Savchenko AS, Ohashi R, Jiang S, Miyamoto K, et al. Lipopolysaccharide induced expression of pentraxin 3 in human neutrophils and monocyte-derived macrophages. *Cell Immunol*. 2007 Aug;248(2):86-94.
26. He X, Han B, Liu M. Long pentraxin 3 in pulmonary infection and acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 May; 292(5):L1039-49.
27. Bowdish DM, Loffredo MS, Mukhopadhyay S, Mantovani A, Gordon S. Macrophage receptors implicated in the "adaptive" form of innate immunity. *Microbes Infect*. 2007 Nov-Dec; 9(14-15):1680-7.

28. Muller B, Peri G, Doni A, Torri V, Landmann R, Bottazzi B, et al. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2001 Jul; 29(7):1404-7.
29. Peri G, Introna M, Corradi D, Iacuitti G, Signorini S, Avanzini F, et al. PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation.* 2000 Aug 8; 102(6):636-41.
30. Kotooka N, Inoue T, Fujimatsu D, Morooka T, Hashimoto S, Hikichi Y, et al. Pentraxin3 is a novel marker for stent-induced inflammation and neointimal thickening. *Atherosclerosis.* 2008 Mar; 197(1):368-74.
31. Okutani D, Han B, Mura M, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. High-volume ventilation induces pentraxin 3 expression in multiple acute lung injury models in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007 Jan; 292(1):L144-53.
32. Bajwa EK, Boyce PD, Januzzi JL, Gong MN, Thompson BT, Christiani DC. Biomarker evidence of myocardial cell injury is associated with mortality in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2007 Nov;35(11):2484-90.
33. Mauri T, Coppadoro A, Bellani G, Bombino M, Patroniti N, Peri G, et al. Pentraxin 3 in acute respiratory distress syndrome: an early marker of severity. *Crit Care Med.* 2008 Aug;36(8):2302-8.
34. Crapo RO, Morris AH, Gardner RM. Reference spirometric values using techniques and equipment that meet ATS recommendations. *Am Rev Respir Dis.* 1981 Jun;123(6):659-64.
35. American Thoracic Society. Standardization of spirometry:1987 update. *Am Rev Respir Dis.* 1987 Nov;136(5):1285-98.
36. Pepsys J. Skin tests diagnosis. In: Gell PH, Coombs RD, Lachman PJ, editors. *Clinical aspects of immunology.* Third ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1975. p. 55-80.
37. Juniper EF, Cockcroft DW, Hargreave FE. Histamine and methacoline inhalation test: a laboratory tidal breathing protocol. Lund: Astra Dracon AB; 1991.
38. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J.* 1996 Jun;9(6):1174-80.
39. Szucs G, Timar O, Szekanecz Z, Der H, Kerekes G, Szamosi S, et al. Endothelial dysfunction precedes atherosclerosis in systemic sclerosis--relevance for prevention of vascular complications. *Rheumatology (Oxford).* 2007 May;46(5):759-62.
40. Han B, Mura M, Andrade CF, Okutani D, Lodyga M, dos Santos CC, et al. TNFalpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK. *J Immunol.* 2005 Dec 15;175(12):8303-11.
41. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Feb;161(2 Pt 1):475-8.

42. Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, et al. Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Sep;162(3 Pt 1):1172-4.
43. Lee SVS PM, Marques LJ, Ferreira SC, Pizzichini E. Inflamação das vias aéreas em asmáticos virgens de tratamento com esteróides: Características do escarro induzido. *J Pneumol*. 2003;29(4):188-95.
44. Balzano G, Stefanelli F, Iorio C, De Felice A, Melillo EM, Martucci M, et al. Eosinophilic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. Relationship with neutrophils and airway function. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Nov;160(5 Pt 1):1486-92.
45. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Feb;155(2):449-53.

NORMAS ADOTADAS

Este trabalho foi realizado seguindo a normatização para trabalhos de conclusão do Curso de Graduação em Medicina, aprovada em reunião do Colegiado do Curso de Graduação em Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina, em 27 de novembro de 2005.

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PARTICIPANTE

TÍTULO: “Validade e Propriedades Discriminatórias da Medida da Pentraxina Longa 3 (PTX3) na Fase Líquida do Escarro Induzido. ”

MÉDICO DO ESTUDO: Dra. Marcia Margaret Menezes Pizzichini
Hospital Universitário – UFSC
Núcleo de pesquisa em asma e inflamação das vias aéreas – NUPAIVA

INTRODUÇÃO:

Os pronomes “você” e “seu” referem-se ao participante do estudo em todo este formulário de consentimento. O objetivo deste formulário é dar a você informações sobre esta pesquisa. Você só deve participar deste estudo se desejar. Você pode se recusar a participar ou pode sair do estudo a qualquer momento sem qualquer penalidade. Assinando este formulário, você concorda em participar do estudo.

OBJETIVO DESTE ESTUDO:

Você foi convidado a participar deste estudo por não ter nenhuma doença respiratória crônica e não fumar ou por apresentar asma ou bronquite crônica (DPOC) causada pela fumaça do cigarro. O objetivo deste estudo é determinar se é possível medir um novo marcador no seu escarro. O método da indução do escarro já vem sendo utilizado por médicos e pesquisadores para o diagnóstico e tratamento de doenças das vias aéreas e dos pulmões há alguns anos. Com isto, planeja-se validar essa medida de inflamação no escarro e utilizar para facilitar o tratamento da asma e da bronquite crônica.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO:

Este é um estudo que envolverá cerca de 30 pessoas com idade superior a 18 anos, residentes na grande Florianópolis. Estas pessoas não devem apresentar nenhuma doença respiratória crônica e nem tampouco estar fumando ou ter fumado no passado, ou apresentar asma ou bronquite causada pela fumaça do cigarro.

Sua participação no estudo consistirá em apenas uma visita ao centro de estudo, quando será realizado um questionário sobre sintomas respiratórios, assim como alguns exames complementares para excluir a presença de doenças respiratórias ou para comprovar que você tem asma ou DPOC. Se estes testes demonstrarem que você é hígido, asmático ou portador de DPOC, você será submetido então à indução do escarro, que é uma forma de induzir a produção de uma pequena quantidade de secreção das vias aéreas (escarro) para a posterior análise de suas células sob o microscópio.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO:

Os seguintes procedimentos serão conduzidos durante sua visita ao NUPAIVA:

- Será pedido que você leia e assine este formulário de consentimento informado antes de serem realizados quaisquer testes ou procedimentos.
- Revisão das suas condições médicas atuais e passadas, incluindo o uso de quaisquer medicamentos.
- Exame físico, incluindo aferição de peso e altura.
- Espirometria: teste respiratório que requer que você respire em um tubo ligado a uma máquina que mede quanto ar você tem nos pulmões e sua capacidade de soprar o ar para fora.
- Teste de broncoprovocação pela Metacolina (apenas se você for saudável ou sua asma não contrair seus brônquios): Este teste serve para determinar a sensibilidade de seus brônquios. Você realizará a espirometria antes e depois de receber uma nebulização com diferentes quantidades de metacolina.
- Indução do escarro:
- Teste alérgico cutâneo:

RISCOS E DESCONFORTOS:

Os testes a que você será submetido são procedimentos padronizados e utilizados corriqueiramente na prática médica, e em geral se associam com riscos insignificantes. O teste da metacolina e da inalação da solução salina podem causar sintomas leves de aperto no peito, chio ou tosse. Esses sintomas desaparecem rapidamente após o uso de um broncodilatador. Além disso, a inalação de solução salina para induzir o escarro pode ter gosto desagradável e provocar leve irritação na garganta, que desaparece logo após o teste. O teste de alergia é realizado na pele e, se for positivo, pode provocar coceira, inchaço e vermelhidão no local, como se fosse uma mordida de pernilongo.

Após a realização dos testes você poderá exercer suas atividades rotineiras normalmente, sem nenhuma restrição.

CONFIDENCIALIDADE

Sua identidade, incluindo seu nome completo e as informações obtidas sobre você durante este estudo permanecerão confidenciais até onde possível por lei. No entanto, o médico do estudo e outros médicos ligados ao centro do estudo poderão revisar seus registros médicos e o formulário de consentimento. Os resultados deste estudo podem ser publicados em jornais científicos ou apresentados em encontros médicos, mas você não será identificado pelo nome.

ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas deste hospital. Se você decidir participar, você deverá primeiramente assinar este Termo de Consentimento Informado declarando seu acordo em participar espontaneamente, e confirmando que você leu e entendeu todas as informações fornecidas neste termo.

É garantida a sua liberdade de se retirar deste estudo a qualquer hora que você desejar sem causar nenhum prejuízo à continuidade do seu tratamento nesta instituição.

CONTATOS

O médico do estudo ou o pessoal do estudo responderá quaisquer perguntas que você tiver sobre este estudo e sobre os resultados dos testes que serão realizados. Entre em contato sempre que tiver qualquer dúvida sobre o estudo ou sua participação no mesmo.

MÉDICO DO ESTUDO: Dra. Marcia Margaret Menezes Pizzichini

TELEFONE: (48) 3234-7711 NUPAIVA - Hospital Universitário

Se você tiver alguma dúvida ou consideração sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisas (CEP)

Cidade Universitária - Trindade

Florianópolis / SC CEP: 88040 - 900

Telefone: (48) 3234-1755

CONSENTIMENTO EM PARTICIPAR

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo “Validade e Propriedades Discriminatórias da Medida da Pentraxina Longa 3 (PTX3) na Fase Líquida do Escarro Induzido. ”

Eu discuti com o Dr(a)._____ sobre minha decisão em participar neste estudo. Estão claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação neste estudo é voluntária e isenta de despesas.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste serviço.

Paciente:

Nome do Paciente:

_____ Data: ____/____/____

1.1.1.1.1 Assinatura do Paciente:

OBS: Leve para casa, uma cópia deste termo assinado pelo seu médico

1.1.1.1.2 Médico

Declaro que esclareci todos os propósitos do estudo, solucionei todas as dúvidas do paciente e obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Nome do médico:

Data: ____/____/____

1.1.1.1.3 Assinatura do médico

APÊNDICE 2

QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO DO GRUPO CONTROLE

Questionário de avaliação clínica do estudo “Validade e Propriedades Discriminatórias da Medida da Pentraxina Longa 3 (PTX3) na Fase Líquida do Escarro Induzido.”

1. Nome: _____ 2. Idade: _____ anos
3. Sexo: ☐ masculino ☐ feminino 4. Raça: _____
5. Bairro / município onde reside: _____
6. Telefones: _____

- | | NÃO | SIM |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 7. Reside na cidade de Florianópolis há mais de 2 anos? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 8. Fumante atual ou no passado? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 9. Exposto a tabagismo passivo durante a vida (>10 anos)? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 10. Teve asma ou bronquite em algum momento da vida? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 11. Teve ou tem rinite alérgica | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 12. Apresenta tosse, falta de ar ou chiado no peito recorrente? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 13. Apresenta congestão nasal, secreção nasal, espirros ou coceira no nariz recorrentes? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 14. Apresentou sintomas de gripe ou resfriado nos últimos 30 dias? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 15. Já apresentou alguma doença respiratória no passado que tenha deixado seqüela no pulmão? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 16. Apresentou durante a vida exposição ocupacional a inalantes como poeiras ou produtos químicos? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 17. Apresenta atualmente alguma doença que necessite tratamento contínuo com medicamentos? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Se sim, qual (quais)?

Doença	Medicamento

Responsável: _____ Data: / /

APÊNDICE 3

QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO GRUPO ASMA E DPOC

TÍTULO: “Validade e Propriedades Discriminatórias da Medida da Pentraxina Longa 3 (PTX3) na Fase Líquida do Escarro Induzido. ”

Participante número: I_I_I_I_I
(A- Asma D- DPOC)

Iniciais: I_I_I_I_I

Data: __/__/__

INFORMAÇÃO SOBRE O PARTICIPANTE

Nome: _____

Idade: _____ (anos)

Data de nascimento: __/__/__

Cor: _____

Endereço: _____ nº: __

Bairro: _____ Cidade: _____

Fone: (____) _____ Celular: (____) _____

Sexo: ☐ Masculino ☐ Feminino

Peso: _____ Kg Altura: _____ cm

História de tabagismo: Nunca: ____ Atual ____ Ex-fumante: ____

Idade que iniciou a fumar: ____ Idade em que parou de fumar: ____

Nº de Cigarros/dia: ____ Maços/ano: ____

Diagnóstico: ☐ Asma Data do diagnóstico: ____

☐ DPOC Data do diagnóstico: ____

☐ Não se aplica

Data da última exacerbação: _____

Duração da última exacerbação: _____

Uso de bebidas cafeinadas nas últimas 6h:

☐ Sim ☐ Não Qual? _____

Apresenta sintomas respiratórios: ☐ Sim ☐ Não

Quais: ☐ Dispnéia ☐ Sibilos ☐ Opressão torácica ☐ Tosse

☐ Escarro ☐ Despertar noturno ☐ Outros: _____

Espirometria		Previsto	Pré- BD	Pós-BD
	VEF ₁ L %			
	CVF L %			
	VEF ₁ /CVF			
	Reversibilidade	‰:	mL:	

Uso de medicamentos respiratórios:

Medicamento	Dose	Frequência	Tempo de Uso

Outros medicamentos: _____

Uso corticóides: ☐ Sim: Desde: _____

☐ Não: Uso prévio: ☐ Não

☐ Sim: Última dose em: ____/____/____

Doenças associadas: ☐ _____ ☐ _____ ☐ _____ ☐ _____

☐ _____ ☐ _____ ☐ _____ ☐ _____

Atendimento na emergência ou hospitalização por causa respiratória no último ano:

☐ Sim ☐ Não

Infecção respiratória nas últimas 4 semanas: ☐ Sim ☐ Não

Uso de ATB nas últimas quatro semanas: ☐ Sim ☐ Não

História de alergia: ☐ Sim ☐ Não alérgenos: _____

Apresenta história de intolerância a:

Aspirina ☐ Sim ☐ Não

Outros antiinflamatórios não hormonais ☐ Sim ☐ Não

FICHA DE AVALIAÇÃO

A avaliação dos trabalhos de conclusão do Curso de Graduação em Medicina obedecerá aos seguintes critérios:

1º. Análise quanto à forma (O TCC deve ser elaborado seguindo a normatização para trabalhos de conclusão do Curso de Graduação em Medicina, aprovada em reunião do Colegiado do Curso de Graduação em Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina, em 17 de Novembro de 2005.);

2º. Quanto ao conteúdo;

3º. Apresentação oral;

4º. Material didático utilizado na apresentação;

5º. Tempo de apresentação:

- 15 minutos para o aluno;

- 05 minutos para cada membro da Banca;

- 05 minutos para réplica

DEPARTAMENTO DE: _____

ALUNO: _____

PROFESSOR: _____

NOTA

1. FORMA.....

2. CONTEÚDO.....

3. APRESENTAÇÃO ORAL.....

4. MATERIAL DIDÁTICO UTILIZADO.....

MÉDIA: _____ (_____)

Assinatura: _____